

PCT/JP00/02733

日本国特許庁 26.04.00  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 4月27日

REC'D 26 JUN 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第120491号

出願人  
Applicant(s):

株式会社ジェノックス創薬研究所

10/019832

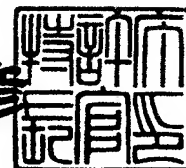
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3042302

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 G1-103  
 【提出日】 平成11年 4月27日  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 C12N 15/00  
 【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
 究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 長洲 毅志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小児病院・  
 小児医療研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研  
 究所

【氏名】 杉田 雄二

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小児病院・  
 小児医療研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研  
 究所

【氏名】 柏原 智子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
 究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 押田 忠弘

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
 究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 大林 正也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研

【氏名】 究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所  
郡司 誉道

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 大林 泉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 今井 雪穂

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 魯 寧

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小児病院・  
小児医療研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研  
究所

【氏名】 小川 薫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研  
究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所

【氏名】 松井 慶子

【特許出願人】

【識別番号】 597177471

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、
- (e) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (f) 該RNA試料に対して、標識した請求項3に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
- (g) 標識した請求項3に記載のDNAにハイブリダイズする該T細胞由来のRNA量を測定する工程、
- (h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程（g）において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

✓ 【請求項13】 アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、
- (b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、
- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、
- (e) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (f) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、
- (g) 該cDNAを鋳型に、請求項3に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、
- (h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程（g）において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項14】 アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、
- (b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (c) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、
- (d) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (e) 該RNA試料に対して、標識した請求項3に記載のDNAをプローブとして、

ハイブリダイゼーションを行う工程、

(f) 標識した請求項3に記載のDNAにハイブリダイズする該T細胞由来のRNA量を測定する工程、

(g) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(f)において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項15】 アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、

(b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(c) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、

(d) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(e) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

(f) 該cDNAを鋳型に、請求項3に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、

(g) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(f)において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項16】 アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下、株化T細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、

(b) 該刺激を受けた株化T細胞からRNA試料を調製する工程、

(c) 該RNA試料に対して、標識した請求項3に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(d) 標識した請求項3に記載のDNAにハイブリダイズする該株化T細胞由来のRNA量を測定する工程、

(e) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(d)において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項17】 アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物の存在下、株化T細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、
- (b) 該刺激を受けた株化T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (c) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、
- (d) 該cDNAを鋳型に、請求項3に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、
- (e) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(d)において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項18】 T細胞が、花粉症のモデル動物の末梢血から調製される、請求項10または11に記載の方法。

【請求項19】 リンパ球が末梢血から調製される、請求項12から15のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 アレルギー疾患がスギ花粉症である、請求項10から19のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アレルギー疾患、特に花粉症に関連する遺伝子、並びに該遺伝子の発現を指標としたアレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

花粉症を含むアレルギー疾患は多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

【0003】

またアレルギー疾患は、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子

発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

【0004】

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライオンおよびパディー(Liang and Pardee)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

【0005】

アレルギー疾患の中でも花粉症は、近年多くの人に見られる疾患の一つである。花粉症の病因には、環境要因の一つである花粉によって発現が影響を受ける複数の遺伝子が関わっていると考えられる。このような事情から、花粉症に関連する遺伝子を単離することが望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アレルギー疾患、特に花粉症に関連する遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は該遺伝子の発現を指標とした、アレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、既に確立された「蛍光DD(Fluorescent DD)法」(T.Itoら, 1994

，FEBS Lett. 351: 231-236) の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した T細胞RNAサンプルを解析できるDDシステムを新たに開発した。このシステムを用いて、本発明者らは花粉症患者を含む複数の被験者について、花粉飛散の前後の血液からT細胞を採取し、スギ花粉特異的 IgE値の異なる被験者間や花粉飛散前後で発現量に変化する遺伝子のスクリーニングを行い、新規遺伝子（「513」遺伝子）を単離した。

【0008】

本発明者らは、被験者をスギ花粉に対するIgE値の高い群（スギ花粉症素因群）とそれ以外の群（健常者）に分け、単離した「513」遺伝子の発現量を両群において比較解析した結果、該遺伝子が健常者と比較してスギ花粉症素因群において有意に高値を示すことを見出した。このため、本発明者らは、該遺伝子の発現量を指標として、アレルギー疾患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

【0009】

すなわち、本発明は、アレルギー素因を有する者に高い発現を示す遺伝子、および該遺伝子の発現を指標としたアレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。より具体的には、

- 〔1〕 配列番号：1 に記載の塩基配列を含む核酸分子、
- 〔2〕 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む核酸分子、
- 〔3〕 〔1〕 または 〔2〕 に記載の核酸分子に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、
- 〔4〕 〔3〕 に記載のDNAを用いることを特徴とする、〔1〕 に記載の核酸分子の検出方法、
- 〔5〕 アレルギー疾患の検査方法であって、
  - （a）被験者からT細胞を調製する工程、
  - （b）該T細胞からRNA試料を調製する工程、
  - （c）該RNA試料に対して、標識した〔3〕 に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
  - （d）標識した〔3〕 に記載のDNAにハイブリダイズする被験者由来のRNA量を



測定し、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法、

〔6〕アレルギー疾患の検査方法であって、

（a）被験者からT細胞を調製する工程、

（b）該T細胞からRNA試料を調製する工程、

（c）該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

（d）該cDNAを鋳型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、

（e）ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNA量を、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法、

〔7〕ポリメラーゼ連鎖反応をPCR増幅モニター法により行う、〔6〕に記載の方法、

〔8〕T細胞が被験者の末梢血から調製される、〔5〕から〔7〕のいずれかに記載の方法、

〔9〕アレルギー疾患がスギ花粉症である、〔5〕から〔8〕のいずれかに記載の方法、

〔10〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

（a）花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

（b）該モデル動物からT細胞を調製する工程、

（c）該T細胞からRNA試料を調製する工程、

（d）該RNA試料に対して、標識した〔3〕に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

（e）標識した〔3〕に記載のDNAにハイブリダイズする該T細胞由来のRNA量を測定する工程、

（f）対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程（e）において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔11〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

(a) 花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

(b) 該モデル動物からT細胞を調製する工程、

(c) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(d) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

(e) 該cDNAを鋳型に、【3】に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、

(f) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(e)において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

【12】アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

(a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、

(b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、

(c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(d) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、

(e) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(f) 該RNA試料に対して、標識した【3】に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(g) 標識した【3】に記載のDNAにハイブリダイズする該T細胞由来のRNA量を測定する工程、

(h) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(g)において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

【13】アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

(a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、

(b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、

(c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(d) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、

(e) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(f) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

(g) 該cDNAを鋳型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、

(h) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(g)において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔14〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

(a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、

✓ (b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(c) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、

(d) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(e) 該RNA試料に対して、標識した〔3〕に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(f) 標識した〔3〕に記載のDNAにハイブリダイズする該T細胞由来のRNA量を測定する工程、

(g) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(f)において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔15〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

(a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、

(b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(c) 該抗原刺激を受けたリンパ球からT細胞を分離する工程、

(d) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、

(e) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

(f) 該cDNAを鋳型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、

(g) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(f)において増幅

されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔16〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

- (a) 被検化合物の存在下、株化T細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、
- (b) 該刺激を受けた株化T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (c) 該RNA試料に対して、標識した〔3〕に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
- (d) 標識した〔3〕に記載のDNAにハイブリダイズする該株化T細胞由来のRNA量を測定する工程、
- (e) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程（d）において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔17〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって

- (a) 被検化合物の存在下、株化T細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、
- (b) 該刺激を受けた株化T細胞からRNA試料を調製する工程、
- (c) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、
- (d) 該cDNAを鋳型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、
- (e) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程（d）において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔18〕T細胞が、花粉症のモデル動物の末梢血から調製される、〔10〕または〔11〕に記載の方法、

〔19〕リンパ球が末梢血から調製される、〔12〕から〔15〕のいずれかに記載の方法、

〔20〕アレルギー疾患がスギ花粉症である、〔10〕から〔19〕のいずれかに記載の方法、に関する。

【0010】

本発明において、アレルギー疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲン

への曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によってT細胞が免疫応答を示すことを意味する。代表的なアレルギー疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。

【0011】

なお、本発明における「核酸分子」には、DNAおよびRNAが含まれる。また、本発明における「アレルギー疾患の検査」には、アレルギー疾患を発症している患者に対する検査だけでなく、アレルギー疾患を発症していない被験者に対してアレルギー素因を有するか否かを判定するための検査も含まれる。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、個体のスギ花粉に対するIgE産生反応に相関する新規な遺伝子「513」に関する。本発明者らにより見出された「513」cDNAの塩基配列を配列番号：1に示す。

【0013】

本発明者らにより単離された「513」cDNAの塩基配列は、「513」cDNAの部分配列であるが、当業者においては、配列番号：1に記載の「513」cDNAの配列情報を基に、「513」の全長cDNAを単離することは、通常行いうる。即ち、「513」由来の配列をプローブとしてT細胞cDNAライブラリーなどをハイブリダイゼーションによってスクリーニングする方法や、「513」由来の配列をプライマーとして用い、T細胞cDNAライブラリーなどのDNAを鋳型として、プライマーに特異的なサイズの増幅産物が得られることを指標としてライブラリーをスクリーニングしてcDNAの全長を取得する方法がある。また、「513」由来の配列をプライマーとして用い、T細胞などのmRNAを一本鎖cDNAに変換し、末端にオリゴマーを付加してからPCRを行うRACE法(Frohman, M. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA

， 85: 8992, 1988) によって「513」の配列を延長する方法がある。

【0014】

本発明における「配列番号：1に記載の塩基配列を含む核酸分子」には、このように配列番号：1に記載の「513」cDNAの配列情報を基に単離しうる、「513」の全長cDNAが含まれる。

【0015】

「513」は、アトピー素因群（スギ花粉に対する IgE値が 3.5 AU/ml以上）の方がアトピー非素因群よりも有意に高い発現を示した。従って、「513」の遺伝子の発現（mRNAへの転写およびタンパク質への翻訳を含む）を指標に、アレルギー疾患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。

【0016】

本発明において検査・治療の対照となるアレルギー疾患としては、特にスギ花粉症が好ましい。

【0017】

本発明におけるアレルギー疾患の検査における「513」の遺伝子の発現の検出は、「513」遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術を利用して行うことが可能である。

【0018】

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーとしては、「513」遺伝子に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子が用いられる。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件下で、他の遺伝子をコードするDNAおよび／またはRNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。たとえば、Express Hybridization Solution (CLONTECH社製) 中でプローブと転写膜を68℃でハイブリダイゼーションし、最終的に0.1X SSC, 0.05% SDS溶液にて、50℃で洗浄することにより、ストリンジেন্টな条件とすることができる。

## 【0019】

これら核酸分子は合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識としては、例えば、DNAポリメラーゼ1を用いるニックトランスレーションによる標識、ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識、クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) *Genes Probes: A Practical Approach*. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)、RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg, PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) *Nucleic Acid Res.*, 12, 7035-7056)、放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) *Nonisotopic DNA Probing Techniques*. Academic Press) 等が挙げられる。

## 【0020】

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。

## 【0021】

一方、遺伝子増幅技術を利用した方法としては、例えば、RT-PCR法を用いることができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程において実施例8に示すようにPCR増幅モニター法を用いれば、「513」遺伝子の発現のより正確な定量を行うことができる。

## 【0022】

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象 (DNAもしくはRNAの逆転写産物) にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの 5'-3' エクソヌクレアーゼ (exonuclease) 活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに

行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6): 357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700 (パーキンエルマー社) を用いることができる。

#### 【0023】

また、本発明のアレルギー疾患の検査は、「513」によりコードされるタンパク質を検出することにより行うことも考えられる。このような検査方法としては、例えば、「513」によりコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェスタンブロットティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

#### 【0024】

本発明の「513」によりコードされるタンパク質の抗体は、当業者に周知の技法を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40)。抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば「513」遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。

#### 【0025】

本発明におけるアレルギー疾患の検査の結果、本発明の遺伝子の発現が有意に高ければ、被験者は例えばスギ花粉抗原のようなアレルゲンに対するIgE値が高く、アレルギー素因を有すると判定することができる。アレルゲン特異的抗体価や、症状などと併せて、本発明の遺伝子の発現レベルの測定を、アレルギー疾患の検査に用いることが可能である。

#### 【0026】



T細胞に発現する「513」遺伝子は花粉抗原に対する特異的IgEの高い、花粉症患者群において発現が増大している。スギ花粉以外の抗原に対する応答性を示すアレルギー患者においても、当該抗原に対するT細胞の応答性の亢進している状態で「513」遺伝子の発現が増大する可能性がある。このようなケースでは「513」遺伝子の発現増大がT細胞の応答性の亢進に対応しており、従って「513」遺伝子の発現をモニターすることによってアレルギー疾患治療薬のスクリーニングを行うことができる。

本発明のアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニング方法は、*in vivo*で行なうことも *in vitro*で行なうこともできる。*in vivo*でのスクリーニングにおいては、例えば、マウス等のモデル動物に、候補薬剤の投与および花粉抗原での刺激を行った後、末梢血よりT細胞を分離し、「513」の転写産物を測定する。あるいは、マウス等のモデル動物に候補薬剤を投与した後、末梢血よりリンパ球を分離し、該リンパ球をスギ花粉抗原等で *in vitro*で刺激する。該刺激後のリンパ球からT細胞を分離し、その「513」遺伝子の転写産物を測定する。これら測定の結果、「513」遺伝子の転写量を低下させる化合物を選択する。ここで花粉抗原による刺激は、T細胞において抗原特異的なアレルギー反応を惹起し、それに対する候補化合物の治療効果を判定することを目的として行うものである。

## 【0027】

また、*in vitro*でのスクリーニングにおいては、例えば、花粉症のヒトまたはマウス等から末梢血リンパ球を採取し、スギ花粉抗原で、該末梢血リンパ球を *in vitro*で刺激する。*in vitro*刺激の際に候補化合物を添加する。その後、刺激された末梢血リンパ球からT細胞を分離し、「513」の転写産物を測定する。この測定の結果、「513」遺伝子の転写量を低下させる化合物を選択する。

## 【0028】

また、本発明のアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニングは、株化T細胞を用いて行なうこともできる。例えば、Molt4細胞、Jurkat細胞などの株化T細胞をリンパ球刺激物質で *in vitro*で刺激する。リンパ球刺激物質としては、例えば、カルシウムイオノフォア (A23187)、PMA、フィトヘマグルチニン (PHA) などが挙げられる。*in vitro*刺激の際に候補薬剤を添加する。その後、該株化T

細胞における「513」遺伝子の転写量を測定する。この測定の結果、「513」遺伝子の転写を低下させる化合物を選択する。

【0029】

アレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニングにおける「513」の遺伝子の発現の検出は、本発明のアレルギー疾患の検査と同様、「513」遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術を利用して行うことが可能である。

【0030】

ハイブリダイゼーション技術を利用した方法としては、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。一方、遺伝子増幅技術を利用した方法としては、RT-PCR法を用いることができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程において実施例8に示すようなPCR増幅モニター法を用いれば、「513」遺伝子の発現のより正確な定量を行うことができる。

【0031】

これらスクリーニングに用いる被検化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

【0032】

本発明のアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニング方法により単離される化合物は、花粉抗原等のアレルゲンに対するアレルギー素因を改善する薬剤の候補になる。

【0033】

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面

活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【0034】

##### 【実施例】

##### 【実施例1】 10人の成人ボランティアからの血液採取

花粉飛散前後のT細胞を採取するため、成人ボランティア10名(A~J)から10 mlの血液サンプルを、花粉飛散前および花粉飛散後に採取した。最初の血液サンプルは、日本のスギ花粉飛散の季節の前(1997年1月および2月)に採取し、2回目は日本のスギ花粉飛散後(1997年3、4および5月)に採取した。ボランティアのうち8人については、2つの時期のサンプルを得た。残る2名のボランティアに関しては、花粉飛散後のサンプルのみ入手できた。これらの血液サンプルの一部を用いて、スギ花粉特異的IgEの量を測定した。特異的IgEの測定はペーパーディスクを固相とするRAST法 (radio allerge sorbent test, Wide, L. et, al.: Lancet 2: 1105-1107, 1967) を改良したCAP RAST法 (Pharmacia社) により行った。Pharmacia社製の標準の抗体価を含む血清を用いて、それを基準にしてそれぞれの検体のIgE抗体価 (単位はPharmacia RAST Unit, PRU、あるいはAU (arbitrary unit) とも表示する) を決定した。

#### 【0035】

測定された各被験者における花粉飛散前後でのスギ花粉特異的IgE値を図1に示す。図に示されるように、10人の被験者の大半で、花粉被曝後にスギ花粉特異的IgEの血清中の濃度が増加した。アトピー素因を有するかどうかは、スギ花粉特異的IgEのCAP RAST試験の値が2より大きいかどうかで判断した。すなわち、被験者A~GおよびIの8人の被験者をアトピー素因群 (以後「患者」とも記す)、被験者H、Jの2人を健常者 (以後「正常群」とも記す) とした。8人のアトピー素因を有する被験者のうち7人が、花粉飛散後にアレルギー性鼻炎の症状を示した。

## 【0036】

## [実施例2] 血液試料からのリンパ球画分の調製

血液10 mlからT細胞を調製する場合は、以下のようにした。まずノボ社製のヘパリン1 mlで注射筒壁を万遍なく処理し、最終濃度50 unit/mlのヘパリンを含む10 ml注射筒に採血した。このとき一人の採血に22G針を2本準備した。注射針をはずし、50 mlの遠心チューブ（ポリプロピレン製）に移した。1500 rpm、室温で5分間遠心し、できるだけ表面近くから1.1 mlを採取し、15000 rpmで5分間、4℃で遠心して上清1 mlを血漿(plasma)として回収した。血漿を回収した残りに3%のデキストラン（ナカライ社製）を含む0.9% NaClを等量（9 ml）加えて静かに数回転倒させて混和した。その後30分間室温で静置した。PRP(Platelet rich plasma,血小板に富む血漿)を別の15 ml遠心チューブに移し、1200 rpm（トミー社製の遠心機で150×gに相当する）で5分間、室温で遠心した。遠心後、血小板は上清にあった。沈殿した細胞をギブコ社等から入手したCa、Mg不含のHBSS 5 mlに懸濁した。これを、パスツールピペットを用いてFicol Paque（ファルマシア社製）が5 mlが入ったチューブ（ファルコンチューブ：2006または2059；ポリプロピレン製）1本に上層した。1200 rpmで5分間遠心後、1500 rpm（Tomy社製の遠心機で400×gに相当する）で30分間室温で遠心した。その結果、顆粒細胞(granulocyte)、赤血球(erythrocyte)が沈殿し、フィコール層を挟んで中間層にリンパ球(lymphocyte)、単球(monocyte)、血小板(platelet)が含まれた。

## 【0037】

パスツールピペットで中間層を回収し、2～3倍の容量のBSA/PBS(0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS, pH7.2；使用直前に脱気した)を添加し、1200 rpm、4℃で5分間遠心した。沈殿を回収し、BSA/PBSで2回洗浄した。2回目の洗浄後、細胞を5 mlに懸濁し、その一部をトリパンブルーで2倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約 $1 \times 10^7$ であった。これをリンパ球画分とした。

## 【0038】

## [実施例3] リンパ球画分からのT細胞の分離

実施例2で得たリンパ球画分を1200 rpmで4℃、5分間遠心し、100  $\mu$ lあたり $10^8$ になるようにBSA/PBSに懸濁した。容量は約20  $\mu$ lになった。これをエッペンド

ルフチューブ (1.5 ml) に移し、CD3マイクロビーズ液を添加した。その後、30分間4~10℃に放置した (このとき氷上には置かなかった)。この試料をマグネチックセルソーター (MACS) (Miltenyi Biotech Inc. 製) で以下のように処理した。

#### 【0039】

MS<sup>+</sup>/RS<sup>+</sup>カラムをMini MACSまたはVario MACSセパレーションユニットに装着した (針は付けなかった)。500  $\mu$  l のBSA/PBSをカラムに静かにアプライし、バッファーは流し出した。次にCD3マイクロビーズ標識した細胞をカラムにアプライした。カラムを500  $\mu$  l で3回洗浄した (B細胞画分)。カラムをセパレーションユニットからはずし、溶出液を集めるチューブ上に置いた。1 ml のBSA/PBSをカラムにアプライし、カラム添付のプランジャーを用いポジティブ細胞を急速に流し出した。これをT細胞画分とした。

#### 【0040】

得られたT細胞画分について、1200 rpm、5分間4℃で遠心した。沈殿をBSA/PBSで2回洗浄した。2回目の洗浄後、細胞を1 ml に懸濁し、その一部をトリバンブールで2倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約  $4 \times 10^6$  であった。

#### 【0041】

##### [実施例4] T細胞からの全RNAの調製

T細胞からの全RNAの調製は RNeasy Mini (Qiagen 製) を用い、原則として添付のマニュアルに従い行った。操作はすべて手袋を着用して、室温で行った。またウォッシュバッファーRPEに4倍量のエタノールを加えた。リシスバッファーRLTには10  $\mu$  l/ml の2-メルカプトエタノールを加えた。細胞浮遊液を1000~1200 rpm で5分間遠心し、上清をアスピレーションで除いた。沈殿に350  $\mu$  l のリシスバッファーRLT (2-メルカプトエタノールを含む) 溶液を加えた。この段階で、RLTバッファー中の細胞のライセートは、-70℃で保存可能であった。細胞のライセートを冷凍保存していた場合は、37℃で10~15分間インキュベートして、不溶物が見えるようなら最大速度で3分間遠心し、上清のみを回収した。このライセートを20Gのカテラン針を付けた注射筒でホモゲナイズ後、キアシュレッダー (QIAshredder) で処理した。 (即ち、通常350  $\mu$  l の細胞のライセートをキアシュレッダー

ユニットにピペットマンを用いてアプライした。これを1500 rpmで2分間遠心し、流出液を回収した。) 350  $\mu$ lの70%エタノールを加え、ピペッティングしてよく混ぜた。RNeasyスピンカラムを添付の2 mlチューブに装着し、細胞のライセート混合物をアプライし、8000 $\times$ g(11500 rpm)で1分間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファ―RW1 700  $\mu$ lをカラムにアプライし、5分間フタをした形で立てた。11500 rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。カラムを新しい2 mlチューブに装着し、ウォッシュバッファ―RPE (エタノールを含む) 500  $\mu$ lをカラムにアプライした後、11500 rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファ―RPE 500  $\mu$ lをカラムにアプライし、最大速度で2分間遠心した。カラムを新しい1.5 mlチューブに装着し、DEPC処理した水30  $\mu$ lをアプライし、フタをして10分間立てた。11500 rpmで10分間遠心し、全RNAを得た。濃度を測定し、量が少なくなら、再度カラムを新しい1.5 mlチューブに装着し、DEPC処理した水30  $\mu$ lをアプライし、フタをして10分間立て、11500 rpmで10分間遠心した。

## 【0042】

## [実施例5] 全RNAのDNase処理

T細胞から調製した全RNAからDNAを除くため、DNase処理を行った。反応は2ユニットのDNase (ニッポンジーン社) および50ユニットのRNaseインヒビター (ファルマシア社) を含む100  $\mu$ lの1 $\times$ DNaseバッファ― (ニッポンジーン社) 中で行った。これを37℃15分間インキュベートした後、等量のPCI (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を加え、ボルテックスした。12000 rpmで室温、10分間遠心し、上層(水層)を新しい1.5 mlチューブに移した。1/10量の3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、2.5倍量の100%エタノールおよびエタ沈メイト1  $\mu$ lを加えて、転倒混和させた。-20℃で15分間静置させた後、12000 rpmで4℃、15分間遠心し、上清を除去し、70%エタノールを加えた。沈殿がはがれる程度にタッピングした後、上清をきれいに除去した。3分間乾燥させ、10~20  $\mu$ lのDDW(DNaseおよびRNase不含)に溶解させた。濃度を測定し、使用まで-80℃に保存した。

## 【0043】

## [実施例6] T細胞から調製した全RNAを用いたディファレンシャルディスプレイ

## レイ (DD) 解析

T細胞から調製した全RNAを用いた蛍光ディファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display, 「DD」と略記する) 解析は文献 (T.Itoら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) に記載の方法に準じて行った。T細胞から調製した全RNAを逆転写し、cDNAを得た。第一次DD-PCR反応用には3種のアンカープライマーの各々について全RNAの各0.2 $\mu$ gを用いてcDNAを調製した。第二次DD-PCR反応用には、3種のアンカープライマーの各々についてRNA 0.4 $\mu$ gを用いてcDNAを調製した。いずれのcDNAも、0.4ng/ $\mu$ l RNA相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1反応あたり1 ng RNA相当のcDNAを用いてDD-PCR反応を行った。反応液の組成は表1の通りである。

【0044】

【表1】

cDNA (0.4ng/ $\mu$ l RNA相当)	2.5 $\mu$ l
任意プライマー (2 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
10 $\times$ AmpliTaq PCRバッファー	1.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP	0.8 $\mu$ l
50 $\mu$ M アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1 $\mu$ l
Gene Taq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
AmpliTaq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ l
総量	10.0 $\mu$ l

【0045】

PCRの反応条件は、「95℃3分、40℃5分、72℃5分」を1サイクル、続いて、「94℃15秒、40℃2分、72℃1分」を30サイクルの後、72℃5分、その後連続的に4℃にした。

## 【0046】

使用したプライマー対はアンカープライマーであるGT15A（配列番号：2）、GT15C（配列番号：3）、およびGT15G（配列番号：4）に対して任意プライマーをそれぞれAG 1～110、AG 111～199、およびAG 200～287を組み合わせ、計287組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしてはGC含量50%の10ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

## 【0047】

ゲル電気泳動は、6%変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 $\mu$ lの試料をアプライし、40Wで210分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザーFMBIO IIを用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

## 【0048】

## [実施例7] DD解析で切り出したバンドの増幅と配列決定

多数の任意プライマーを用いて2回のDD解析を行った。花粉飛散前後または患者と健常者のグループの間で差のあるバンドを選択し、2回の実験で再現性のあるバンドをゲルから切り出した。

## 【0049】

切り出したバンドの1つ（「513」と称する）についてさらに解析を進めた。「513」のバンドはアンカープライマーとしてGT15C（配列番号：3）を、任意プライマーとしてAG136（TCATGCAGAC／配列番号：5）を用いたDD解析によって見出された。

## 【0050】

「513」の塩基配列を決定するために、「513」のバンドを含むゲルを切り出し、TE溶液に保存し60℃、10分加温してDNAをゲルから溶出させた。このTE溶液を鋳型としてDD-PCRと同条件でPCRを行い、約360bpのDNA断片を増幅した。アンカープライマーとして、GT15Cを、任意プライマーとしてAG136を用いた。増幅したDNA断片をプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）にてクローニングし、約360bpのDNA断片を保持するプラスミドp513-122を得た。プラスミドDNAを用いて常法に従いDNA断片の塩基配列を決定した。

## 【0051】



【実施例8】 ABI-7700による定量

ABI-PRISM7700を用いたTaqMan法により、「513」の発現量の定量を行った。この方法はPCR増幅されたDNA鎖を蛍光色素を用いてリアルタイムに定量検出するシステムである。

【0052】

定量のために新たに1998年春にスギ花粉飛散前・後の血液試料を22名のボランティアから採取し、T細胞を調製して全RNAを抽出した。計44種の全RNA試料を用いて目的の遺伝子の発現量を定量した。

【0053】

実施例1と同様にしてスギ花粉、ヒノキ花粉、ヤケヒョウダニ、およびコナヒョウダニの特異的IgE値、並びに総IgE値を測定した(表2)。

【0054】

【表2】

特異的IgE値

被験者	血液採取時期	特異的 IgE (UA/ml)				総IgE (UA/ml)
		スギ	ヒノキ	ヤケヒョウヒダニ	コナヒョウヒダニ	
A	飛散前	42.7	5.46	1.09	<0.34	300
	飛散後	83.2	7.85	1.28	<0.34	460
B	飛散前	31.9	4.33	72.5	52.6	770
	飛散後	36.8	3.56	78.8	47.9	840
C	飛散前	15.2	1.5	68.7	66.1	450
	飛散後	20.3	1.32	64.3	49.7	330
D	飛散前	13.9	1.11	39.3	63.4	200
	飛散後	18.4	0.81	31.9	54.7	120
E	飛散前	5.25	0.48	<0.34	<0.34	30
	飛散後	8.33	0.46	<0.34	<0.34	38
F	飛散前	6.64	0.39	<0.34	<0.34	26
	飛散後	8.21	0.47	<0.34	<0.34	27
G	飛散前	1.29	<0.34	<0.34	<0.34	26
	飛散後	4.02	<0.34	<0.34	<0.34	30
H	飛散前	1.99	0.41	26.5	36.1	220
	飛散後	3.65	0.53	23.2	29.5	150
I	飛散前	0.93	<0.34	54.6	51.7	130
	飛散後	3.51	<0.34	43.3	39.9	100
J	飛散前	3.55	0.68	0.55	<0.34	96
	飛散後	2.77	0.42	0.39	<0.34	78
K	飛散前	1.2	<0.34	<0.34	<0.34	96
	飛散後	2.72	<0.34	<0.34	<0.34	110
L	飛散前	0.95	0.39	1.3	1.8	13
	飛散後	2.5	0.51	1.45	2.38	18
M	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	36
	飛散後	2.08	<0.34	<0.34	<0.34	43
N	飛散前	0.42	<0.34	<0.34	<0.34	22
	飛散後	1.67	<0.34	0.45	<0.34	73
O	飛散前	0.54	<0.34	28.1	27.2	180
	飛散後	1.42	<0.34	27.2	26.3	160
P	飛散前	0.38	<0.34	5.08	3.65	280
	飛散後	0.68	<0.34	4.49	3.02	240
Q	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	<5.0
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	<5.0
R	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	53
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	62
S	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	420
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	370
T	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	82
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	62
U	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	18
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	16
V	飛散前	<0.34	<0.34	0.79	0.81	180
	飛散後	<0.34	<0.34	0.78	0.9	160

【0055】

実施例 7 において決定した DD バンドの塩基配列を基にしてプライマー 513-TQ1 (GCAGACAGTTCGATGCTTTTCC/配列番号: 6)、513-TQ2 (TTTCTTATGAGGTCCTGCCTTG/配列番号: 7)、および TaqMan プロブ 513-TQM (AGGGCAGTTTGCATCCTAAAGGTTGTTAAGG/配列番号: 8) を設計、合成し定量反応に用いた。TaqMan プロブ 513-TQM は 5' 端を FAM (6-carboxyfluorescein) で、3' 端を TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) で蛍光標識して用いた。鋳型には 44 種の全 RNA からポリ T (12~18 マー) をプライマーとして逆転写した cDNA を用いた。コピー数を算出する標準曲線のために実施例 7 で得たプラスミド p513-122 の段階希釈液を鋳型として反応を行った。PCR 増幅のモニタリングのための反応液の組成は表 3 に示した。また、試料中の cDNA 濃度の差を補正するため、 $\beta$ -アクチン ( $\beta$ -actin) 遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子 (513) のコピー数を算出した。

【0056】

【表 3】

ABI-PRISM 7700 の反応組成 (1 ウェルあたりの反応量)

滅菌蒸留水	25.66 ( $\mu$ L)
10x TaqMan バッファー A	5
25mM $MgCl_2$	7
dATP (10mM)	1.2
dCTP (10mM)	1.2
dGTP (10mM)	1.2
dUTP (10mM)	1.2
Forward Primer (100 $\mu$ M)	0.15
Reverse Primer (100 $\mu$ M)	0.15
513 TaqMan プロブ (6.7 $\mu$ M)	1.49
AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ $\mu$ L)	0.5
テンプレート溶液	5

---

総量

50

---

【0057】

$\beta$ -アクチンのコピー数で補正した各試料中の「513」の存在数（コピー数）を表4に示す。補正は全試料における $\beta$ -アクチンの平均コピーを求め、それを1としたときの各試料中の $\beta$ -アクチンの相対値で各試料中の「513」のコピー数を除した。

【0058】

【表4】

ABI7700による定量値 (copy/ngRNA)  
beta\_actin 補正data

被験者	血液採取時期	バンドID
		513
A	飛散前	661
	飛散後	871
B	飛散前	2880
	飛散後	640
C	飛散前	530
	飛散後	403
D	飛散前	1273
	飛散後	433
E	飛散前	636
	飛散後	692
F	飛散前	665
	飛散後	1391
G	飛散前	692
	飛散後	350
H	飛散前	1137
	飛散後	361
I	飛散前	1169
	飛散後	1717
J	飛散前	1846
	飛散後	891
K	飛散前	443
	飛散後	1007
L	飛散前	1742
	飛散後	539
M	飛散前	721
	飛散後	440
N	飛散前	459
	飛散後	342
O	飛散前	662
	飛散後	455
P	飛散前	409
	飛散後	472
Q	飛散前	542
	飛散後	662
R	飛散前	422
	飛散後	25
S	飛散前	435
	飛散後	332
T	飛散前	610
	飛散後	449
U	飛散前	687
	飛散後	455
V	飛散前	679
	飛散後	368

【0059】

この値を用いて二元配置分散分析を行った。群分けは、スギ花粉飛散前と後、または血清中の各特異的IgEについて2回の測定のうち1回でも3.5 AU/ml以上を示した群（高IgEグループ）とそれ以外の群（正常IgEグループ）の2つの要因にわけて検定した。各グループの人数は、たとえばスギ花粉の場合、高IgEグループ10人：正常IgEグループ12人であった。また、総IgEについて200 AU/mlを

示した群とそれ以外の群に分けて検定した。二元配置分散分析の検定はStatView  
ソフトウェア (Abacus Concepts, Inc.) を用いて行った。

## 【0060】

その結果、スギ花粉に対するIgE値で群分けすると、「513」の発現は高IgEグループにおいて正常IgEグループよりも有意に高いことが示された(表5、図2)。飛散前後のデータを合わせた場合の高IgEグループおよび正常IgEグループにおける513の発現量はそれぞれ  $961.8 \pm 626.1$  および  $556.7 \pm 311.8$  コピー/ng RNA (平均±標準偏差) であった。

## 【0061】

【表5】

513		二元配置分散分析P値		
分類		IgE 高/低	飛散前/飛散後	2因子の相互作用
特 異 的 IgE	スギ	0.0100	0.0663	0.5189
	ヒノキ	0.0408	0.0518	0.0907
	ヤケヒョウヒダニ	0.2043	0.0606	0.2496
	コナヒョウヒダニ	0.2043	0.0606	0.2496
総IgE		0.7893	0.0582	0.1872
t-検定		0.0622		

## 【0062】

【実施例9】 「513」のクローニングと塩基配列の解析

Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いて「513」のクローニングを行った。YY-1細胞株のmRNAを用いてMarathon用cDNAを作製し、鋳型として用いた。DDにより単離された「513」の塩基配列に基づいて作製した特異的プライマー 513\_154L (GCTTGTCCTGGGTTTCACTT/配列番号: 9) とキットに添付のアダプタープライマーを用いてPCR反応を行った結果、約1.1kbまでの増幅産物が得られた。塩基配列を決定したところ、これまでに決定した配列を含む1171bpの配列が得られた。この配列を配列番号: 1に示す。

## 【0063】

【発明の効果】

本発明により、スギ花粉特異的IgE値と相関を示す新規遺伝子が提供された。

本発明の遺伝子の発現を指標に、アレルギー素因を有するか否かの検査、およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。

【0064】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

<120> "513", A NOVEL GENE RELATED TO POLLEN ALLERGY

<130> G1-103

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1171

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

actcactata gggctcgagc ggcgcccggg caggtatacc ttcggtgttt ttgagaatct 60  
gagaatgatg gaggagaaat ggaaagatag gaatagaaag agattacatt aggaattaaa 120  
tttcttggtc ctctttttct gatatgaaac caaatiggag gttagatcat ccagaaagag 180  
aatcagtggt ttccagttt tccaacctgc ttgctcataa gaatgacttg gagtggtaga 240

tcttgattca gtcgttctga ggatagcaca aagaatttgt attttagca aacactctcc 300  
 atgattatag tattataagg gaattaaact taaaccttct taaataaag cccccaagtt 360  
 tgaccattta gctcagctat agaattactg aatattttta gtatggcaat actgtcaaga 420  
 aaaagcactt tataatgtgc ttaaatttct tcttttctt tcttttctt ctttttctt 480  
 tcttttctt ctttttctt tcttttttg aaaagtttaa ggctatataa aaaatagaga 540  
 gaatggggct tctcgctatg ctcagcctgt gtgtcatcat tactgtcatg ctggccattg 600  
 tictctctg ctgtgcccg gccctgaggc ctccttcacc tctatccca ccaccactat 660  
 ccagtcagtt tgcgtctgct tccgtggttc acatgaggca gatgaggagt ttgatgcatg 720  
 ctgggtgaca tgcctcaaca agccagagat agatgcctgg gaattgcata aagaattgaa 780  
 cacacttgct ggctatgacc tggttccaga accccaaatc attgatgttg cttcgcaggc 840  
 atgcagacag ttcgatgctt ttcctagggc agtttgcac ctagaggttg ttaaggacaa 900  
 ggcaggacct cataagaaaa tgcctccaa gaactcagac caactttaaa tgaattggga 960  
 atccccactc cagaggacct aggcctagac aaagigtgaa cccagggac aagcgttcca 1020  
 gggatttatt ggtattgcta ctgatgtga aacactcccc tggaaatgct gatgataaca 1080  
 tgttacctta ttgaacacc tttttcttta ttgaataccw aaccatgtta tggttaactg 1140  
 gactttaata aaagggaat gagtttgaac t 1171

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
 Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gttttttttt tttttta

17



<210> 3  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3  
gttttttttt ttttttc

17

<210> 4  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4  
gttttttttt ttttttg

17

<210> 5  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcatgcagac

10

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcagacagtt cgatgctttt cc

22

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ttttttatg aggtcctgcc ttg

23

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Probe Sequence

<400> 8

agggcagttt gcatcctaaa gttgttaag g

31

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gcttgtccct ggggttcaca ctt

23

【図面の簡単な説明】

【図1】

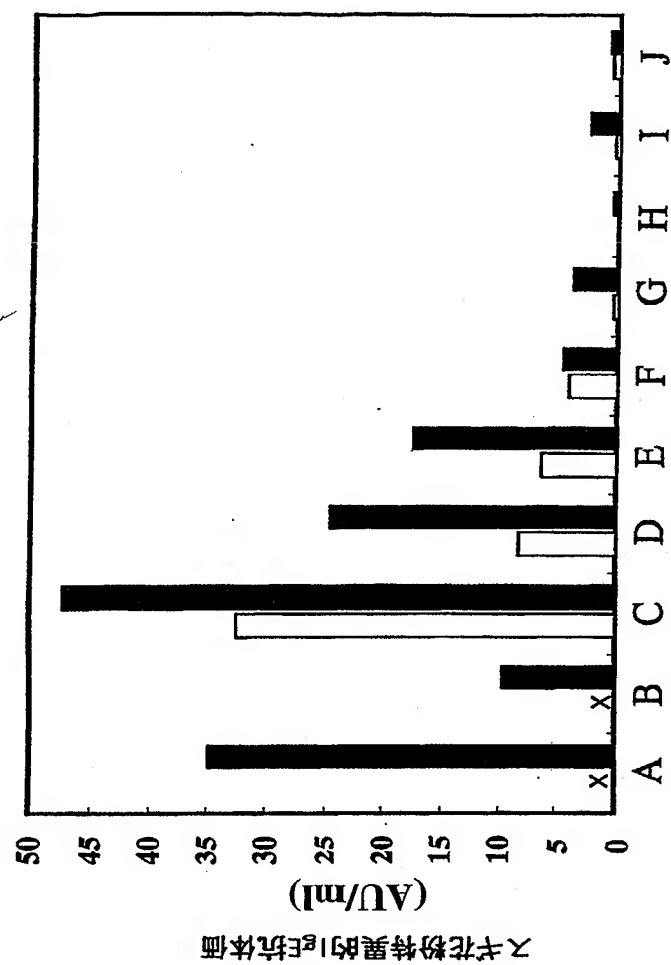
血液を採取した被験者10人、計18の血液試料におけるスギ花粉特異的IgE抗体の抗体価を表す図である。被験者A~J（試料番号1~18）の各血液試料のスギ花粉特異的IgE抗体の値を AU/ml で表した。花粉飛散前を左（白いカラム）、飛散後を右（黒いカラム）に対で表した。被験者AおよびBは、花粉飛散後の血液のみ採取した。

【図2】

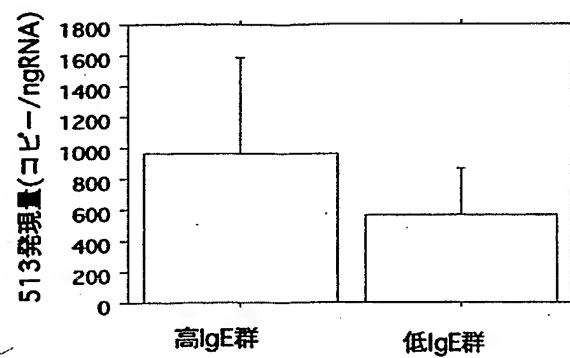
スギ花粉特異的IgE値によって群分けした場合の高IgE群および正常IgE群における「513」の発現変化を示す図である。エラーバーは標準偏差を表す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 スギ花粉特異的IgE値と相関を示す新規な遺伝子およびその利用を提供することを課題とする。

【解決手段】 スギ花粉特異的IgE値が異なる複数の被験者から花粉飛散時期前後にT細胞を調製し、ディファレンシャルディスプレイ法により遺伝子を検索した結果、スギ花粉特異的IgE値が高値を示す被験者で有意に発現が高い新規遺伝子を単離することに成功した。本発明者らは、この遺伝子をアレルギー疾患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597177471]

1. 変更年月日	1997年12月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県つくば市東光台5-1-3
氏 名	株式会社ジェノックス創業研究所